



**Los Libertadores**  
Institución Universitaria  
Personería Jurídica Res. No. 7542 de mayo de 1982

**PROCESO DE PRODUCCION DE BIOTENOL, A PARTIR DE LA BIOMASA  
HIDROLIZADA DE LA EICHHORNIA CRASSIPES CON LA LEVADURA (CÁNDIDA  
UTILIS)**

**CAMILO ANDRES ARIAS REY  
JONATHAN ARMANDO MOLINA GARCIA**

**FUNDACIÓN UNIVERSITARIA LOS LIBERTADORES  
FACULTAD DE INGENIERÍAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA INDUSTRIAL  
BOGOTA D.C 2018**

**PROCESO DE PRODUCCION DE BIOTENOL, A PARTIR DE LA BIOMASA  
HIDROLIZADA DE LA EICHHORNIA CRASSIPES CON LA LEVADURA (CÁNDIDA  
UTILIS)**

**CAMILO ANDRES ARIAS REY  
JONATHAN ARMANDO MOLINA GARCIA**

**TRABAJO DE GRADO PARA  
LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO  
PROFESIONAL EN INGENIERÍA INDUSTRIAL**

**DIRECTOR  
ING. ADOLFO LEON AGATON**

**FUNDACIÓN UNIVERSITARIA LOS LIBERTADORES  
FACULTAD DE INGENIERÍAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA INDUSTRIAL  
BOGOTÁ D.C 2018**



**Nota de Aceptación**

---

---

---

---

---

---

**Presidente del Jurado**

---

**Jurado**

---

**Jurado**

**Bogota D.C. agosto de 2018**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecimiento especial al Ingeniero Adolfo Leon y el Ingeniero Víctor Manuel Carrillo, por sus aportes conocimiento en la materia, acompañamiento y confianza al permitirnos realizar este proyecto de grado.

Agradecemos también a nuestro compañero Jeison Cuchimaque por su acompañamiento en los laboratorios como guía en el desarrollo del mismo.

Agradecimiento profundo a la Fundación Universitaria los libertadores, los cuales durante estos años de formación permitieron el desarrollo de nuevas alternativas energéticas en los laboratorios de la institución como los reactivos que hicieron posible la ejecución de este trabajo de investigación.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	7
INTRODUCCION.....	8
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
2. JUSTIFICACION .....	10
2. OBJETIVOS .....	11
3. MARCO TEÓRICO.....	12
<b>3.1. Etanol</b> .....	12
<b>3.1.1 ¿Qué es el etanol?</b> .....	12
<b>3.1.2 Propiedades físicas.</b> .....	12
<b>3.1.3 Propiedades químicas.</b> .....	12
<b>3.1.4 Usos y beneficios.</b> .....	13
<b>3.1.5 Toxicología.</b> .....	14
<b>3.2 Bioetanol.</b> .....	15
<b>3.3. OBTENCIÓN DE ETANOL POR FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.</b> .....	16
<b>2.2.1 Condiciones que medir y controlar en el proceso de fermentación</b> .....	17
<b>2.2.2 Limitantes de la fermentación</b> .....	18
<b>2.2.3 Etanol a partir de melaza.</b> .....	20
<b>2.2.4 Tratamiento previo de la melaza antes de la fermentación</b> .....	22
<b>2.2.5 Bioquímica de la fermentación alcohólica.</b> .....	23
<b>2.3 CÁNDIDA UTILIS.</b> .....	25
<b>2.3.1 Funciones y usos</b> .....	26
4. METODOLOGIA Y RESULTADOS DE DISEÑO .....	29
<b>4.1 Preparación de la Eicchornia Crassipes “Buchón de Agua”.</b> .....	30
<b>4.1.1 Extracción.</b> .....	30
<b>4.1.2 Secado.</b> .....	30
<b>4.1.3 Triturado.</b> .....	31
<b>4.2 Diseño sistema piloto de fermentación en batch.</b> .....	¡Error! Marcador no definido.
<b>4.2.1 Materiales</b> .....	¡Error! Marcador no definido.
<b>4.3 Sistema de Hidrolisis</b> .....	32
<b>4.4 Sistema de Fermentación</b> .....	34



<b>4.5 Control fermentación alcohólica .....</b>	<b>36</b>
<b>4.5.1 Medición de alcohol.....</b>	<b>36</b>
<b>4.5.2 Medición de glucosa: .....</b>	<b>37</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>42</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>44</b>

## **INDICES**

### **Índice de Tablas**

Tabla 1. Composición de la melaza .....	21
Tabla 2. Aprovechamiento de la melaza de caña.....	22
Tabla 3. Muestreo Hidrolisis .....	33
Tabla 4 Muestra Glucosa vs Alcohol.....	38
Tabla 5 Variables propuestas por (Rittmann y McCARTY, 2000).....	39
Tabla 6 Parámetros iniciales.....	39
Tabla 7 Datos Obtenidos según variables Rittmann y McCARTY, 2000 .....	40

### **Índice de Ilustraciones**

Ilustración 1. Materiales Primas utilizadas para la producción de etanol.....	20
Ilustración 2. Proceso de Obtención de la Melaza .....	20
Ilustración 3. Ruta catabólica del piruvato obtenido mediante glicólisis.....	24
Ilustración 4 conversión del piruvato a etanol .....	25
Ilustración 5. Modelo teórico a proceso de producción de bioetanol a partir de la biomasa .....	29
Ilustración 6. Localización Humedal Engativá Bogotá .....	30
Ilustración 7. Extracción de Eicchornia Crassipes.....	30
Ilustración 8. Proceso de Secado a Temperatura Ambiente .....	31
Ilustración 10. Hidrolisis Acida de Eichhornia Crassipes con NaOH .....	32
Ilustración 11 Sistema de fermentación piloto.....	35
Ilustración 12 Recipientes de izquierda a derecha #1 adicción inoculo de microorganismo,#2 sistema de vacío para muestreo,#3 frasco de muestra. ....	35
Ilustración 14 Medición en agua .....	36
Ilustración 13 Medición en Alcohol.....	36
Ilustración 15 Toma Glucosa a fermentación .....	37

### **Índice de Graficas**

Grafica 1. Comportamiento del pH con Ácido Sulfúrico.....	34
Grafica 2 Comportamiento Consumo de Glucosa y generación de Alcohol .....	38
Grafica 3 Comportamiento consumo sustrato vs levadura .....	41



## RESUMEN

Para la producción de etanol en el mundo se utiliza mayormente como fuente biomasa. Este etanol es denominado, por su origen bioetanol. El etanol puede producirse a partir de un gran número de plantas, con una variación, según el producto agrícola, del rendimiento entre el combustible consumido y el generado en dicho proceso. Este etanol, conocido como bioetanol, es un recurso energético potencialmente sostenible que puede ofrecer ventajas medioambientales y económicas a largo plazo en contraposición a los combustibles fósiles.

Para la producción de bioetanol, se ha diseñado un sistema de fermentación, el cual es realizado dentro del laboratorio de los Libertadores con el fin de generar la fermentación de la levadura *Cándida Utilis* para obtener bioetanol a partir de la biomasa *Eichhornia crassipes*. (Jose, 2004)

El presente trabajo tuvo como objetivo la producción de etanol entre la *Eichhornia crassipes* y la *Cándida utilis*, Se implementa la generación de varios ensayos a través de diferentes concentraciones, con el fin de establecer el mejor porcentaje de producción de alcohol.

Este esfuerzo responde a la necesidad de agrupar información valiosa, que ofrezca una perspectiva sobre las tecnologías que existen para producir este tipo de biocombustible y de cómo se han aplicado a diferentes fuentes, en particular el *Eichhornia crassipes*.



## INTRODUCCION

El etanol se considera con un recurso energético de mayor potencia sostenible a nivel mundial, de alta viabilidad técnica, que brinda grandes ventajas medioambientales y ante todo económicas a largo plazo, puesto que a diferencia del petróleo, este se obtiene a partir de fuentes vivas como microorganismos, los cuales realizan la fermentación de azúcares que pueden provenir de subproducto de grandes procesos industriales; emplear estos subproductos, como sustratos para ser fermentados y obtener etanol, generan una oportunidad importante en el desarrollo de nuevas formas de energía renovable y en los cuales se encuentre un desarrollo sostenible con el medio ambiente. (Jose, 2004)

El etanol es un biocombustible que a través de los años ha obtenido un gran desarrollo a nivel mundial, aun así, Colombia no se ha quedado atrás con la producción de esta energía alternativa, la cual principalmente se ha generado a partir de la caña de azúcar y aceite de palma.

En la búsqueda de nuevas alternativas, se ha realizado un estudio sobre las diversas materias primas y sus respectivas derivadas o transformaciones para la producción de etanol en la actualidad.

Este estudio proporciona una visión general de los métodos potenciales para la producción industrial de etanol. Se presta una atención mayor a la tecnología que producen este alcohol a partir de fuentes renovables. Comprende la recuperación potencial de bioetanol deshidratado y etanol hidratado para su utilización como combustibles de transporte. Entre estas tendencias se destaca:

- La producción de etanol a partir de celulosa utilizando bacterias; este método permite la exclusión de pretratamientos de materias primas intensivos energéticamente, combinando procesos de hidrólisis y fermentación. (Ritslaid, 2010)

Una alternativa viable para la producción de bioetanol es la *E. crassipes* conocida en Colombia como “Buchón de agua”, esta planta acuática es un indicador de contaminación en humedales, ríos etc. debido a su alta reproductividad en aguas contaminadas. En la actualidad se presenta grandes acumulaciones de esta planta en los humedales Juan Amarillo, la Conejera entre otros.

En una situación de deficiencia de petróleo, el bioetanol de levadura y fermentación bacteriana es una fuente alternativa prometedora de combustible.

El objetivo de este estudio fue determinar si la relación entre *Eichhornia crassipes* con la *Cándida Utilis* mejora el crecimiento y la producción de etanol, y crear una oportunidad para usar una fruta regional para producir etanol





## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La escasez o agotamiento de las principales fuentes de energía, en este caso el petróleo (combustible fósil), ha generado que la mayor parte del mundo busque otros métodos de producción de energías, donde se han enfocado en las energías alternativas. Este estudio ha demostrado que, para la generación de dichas energías, los países deben de requerir con algunos factores importantes, como lo es la posición geográfica. Gracias a esto, Colombia cuenta con un gran potencial lo cual ha permitido el crecimiento en los estudios relacionados con ello. (Antioquia, 2018)

Cada vez la demanda del petróleo se acelera debido al crecimiento económico, derivado de la industrialización, mejoras en la infraestructura y urbanización de países en desarrollo, trayendo consigo incrementos en los precios debido al escaso abastecimiento de este producto.

Adicional a esto, la extracción del petróleo como fuente energética, trae consigo el daño natural, no solo por la generación de grandes cantidades de dióxido de carbono, el cual es el principal causante del calentamiento global (Levtona, 2006) sino también por el impacto sobre el territorio donde se realizan dichas explotaciones (Briceño, 2004), estos fenómenos y problemáticas pueden ser minimizadas con la generación de nuevas fuentes energéticas.

El etanol se considera con un recurso energético de mayor potencia sostenible a nivel mundial, de alta viabilidad técnica, que brinda grandes ventajas medioambientales y ante todo económicas a largo plazo, puesto que a diferencia del petróleo, este se obtiene a partir de fuentes vivas como microorganismos, los cuales realizan la fermentación de azúcares que pueden provenir de subproducto de grandes procesos industriales; emplear estos subproductos, como sustratos para ser fermentados y obtener etanol, generan una oportunidad importante en el desarrollo de nuevas formas de energía renovable y en las cuales se encuentre un desarrollo sostenible con el medio ambiente. (Jose, 2004).

Se considera que con el paso del tiempo, sea maximizada la producción de este tipo de energía renovable, el cual permite la minimización de daño ambiental, de igual manera generando la reactivación del agro, para lograr el aumento de producción etanol carburante, sino también aumentar la plantación de aquellos compuestos naturales que permitan dicha generación. De aquí nace la pregunta ¿Cuál es el rendimiento de producción de etanol a través de la *Eichhornia crassipes* y la *Cándida Utilis*?

## 2. JUSTIFICACION

Para la ejecución de las actividades del hombre, es de vital importancia la energía, aunque el crecimiento de la demanda ha vuelto este tema de gran importancia mundial, ya que nacionalmente cada día se enfrenta contra nuevos retos lo cual genera complicaciones en la obtención de energía. El petróleo actualmente se ve como una amenaza constante, puesto que el crecimiento mundial está agotando este recurso natural, el cual se considera no renovable y de difícil consecución; debido a esto el etano es una fuente renovable la cual a nivel mundial ha generado la profundización de investigaciones lo cual a ayudado al crecimiento notable de esta producción. La demanda de esta energía a sido tan alta que en el año 2000 paso de 19 billones de litros a 22 billones de litros en el 2004, año en el cual se reflejó el primer incremento elevado en esta producción (Enriquez, 2004).

La Eichhornia Crassipes surge como una alternativa viable para producción de bioetanol en el proyecto de investigación “Optimización del proceso de producción de bioetanol a partir de la biomasa hidrolizada de la Eichhornia crassipes en los biorreactores desarrollados en la Fundación Universitaria los Libertadores”, debido a su alta composición energética que posee; las microalgas son de rápido crecimiento, se ven a simple vista y se encuentran en mantos acuíferos de agua dulce, salada y aguas residuales, éstas acumulan proteínas, aceites y carbohidratos, y poseen la capacidad para mitigar las emisiones de CO<sub>2</sub> y producir lípidos. Se utilizará los biorreactores y equipos adquiridos en la Fundación Universitaria los Libertadores para el proceso de producción de bioetanol, evaluando con la bacteria Cándida Utilis a partir de la biomasa hidrolizada de la Eichhornia Crassipes.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el proceso de producción de Bioetanol a partir de la biomasa hidrolizada de la *Eichhornia Crassipes* con la levadura *Cándida Utilis* como agente fermentador.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Aplicar el sistema piloto de fermentación en Bath (cerrada) de la Fundación Universitaria lo Libertadores para la obtención de alcohol a través de la *Eichhornia Crassipes* (Sustrato).
- Extraer *Eichhornia crassipes*, secar y triturar para la generación de biomasa a través de la hidrolisis.
- Realizar el proceso de hidrolisis ácida y alcalina al sustrato posterior realizar la fermentación alcohólica.
- Evaluar el comportamiento de la concentración de glucosa durante el proceso de degradación de la biomasa del sustrato para la obtención de bioetanol.
- Analizar los datos obtenidos bajo la reacción generada por los dos procesos para la “Generación de alcohol”.

### **3. MARCO TEÓRICO.**

#### **3.1. Etanol**

El etanol, también denominado alcohol, alcohol etílico y alcohol de grano, es un líquido transparente e incoloro y el principal ingrediente de bebidas alcohólicas como cerveza, vino o brandi. Debido a que puede disolverse fácilmente en el agua y otros compuestos orgánicos, el etanol también es un ingrediente de una variedad de productos, desde productos de cuidado personal y belleza, hasta pinturas, barnices y combustibles.

##### **3.1.1 ¿Qué es el etanol?**

El compuesto químico etanol, o alcohol etílico, es un alcohol que se presenta como un líquido inflamable con un punto de ebullición de 78 °C. Al mezclarse con agua en cualquier proporción, da una mezcla azeotrópica. Su fórmula química es  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ . (Salomon, 2000-2007)

El alcohol es un líquido incoloro y volátil que está presente en diversas bebidas fermentadas. Anteriormente se obtenía el etanol por fermentación anaeróbica de una disolución de azúcares con levadura y posteriormente se realiza el proceso de destilación. Dependiendo del género de Bebida alcohólica que lo contenga, el alcohol aparece acompañado de distintos elementos químicos que lo caracterizan en color, gusto, aroma, entre otros aspectos relevantes.

##### **3.1.2 Propiedades físicas.**

- Estado de agregación Líquido
- Apariencia incolora
- Densidad 810 kg/m<sup>3</sup>; (0,810 g/cm<sup>3</sup>)
- Masa molecular 46,07 uma
- Punto de fusión 158,9 K (-114,1 °C)
- Punto de ebullición 351,6 K (78,6 °C)
- Temperatura crítica 514 K (241 °C)
- Presión crítica 63 atm.

##### **3.1.3 Propiedades químicas.**

- Acidez (pKa) 15,9
- Solubilidad en agua miscible
- KPS n/d
- Momento dipolar n/d D
- Termoquímica
- H<sub>0</sub> gas -235.3 kJ/mol

- H<sub>2</sub>O líquido -277.6 kJ/mol
- S<sub>0</sub> líquido, 1 bar 161.21 J•mol<sup>-1</sup>•K<sup>-1</sup>
- Valores en el SI y en condiciones normales
- (0 °C y 1 atm), salvo que se indique lo contrario.
- Exenciones y referencias

### **3.1.4 Usos y beneficios.**

#### **3.1.4.1 Productos de cuidado personal.**

El etanol es un ingrediente común en muchos cosméticos y productos de belleza. Actúa como astringente para limpiar la piel, como conservador en lociones y para asegurar que no se separen los ingredientes de una loción; también está presente en los aerosoles para el cabello, para que el producto se adhiera al cabello. (ChemicalSafetyFacts.org, 2008)

#### **3.1.4.2 Productos para el hogar**

El etanol se mezcla fácilmente con el agua y muchos compuestos orgánicos, y genera un disolvente efectivo para usar en pinturas, lacas y barnices, como también en productos de cuidado personal y productos de limpieza para el hogar. Como aditivo para los productos de limpieza, el etanol también se usa como conservador porque es eficaz en la anulación de los organismos que podrían representar un peligro para los consumidores. (ChemicalSafetyFacts.org, 2008)

Debido a que el etanol es efectivo para matar microorganismos, como las bacterias, los hongos y los virus, es un ingrediente común en muchos productos de desinfección y antibacteriales.

#### **3.1.4.3 Aditivos alimentarios**

Como aditivo alimentario, el etanol puede ayudar a distribuir uniformemente la coloración de los alimentos, como también realzar el sabor de extractos de alimentos. Por ejemplo, el extracto de vainilla, un aromatizante alimentario común, se elabora mediante el curado y el procesamiento de vainas de vainilla en una solución de etanol y agua. (ChemicalSafetyFacts.org, 2008)

Las bebidas destiladas parten igualmente de una materia rica en azúcares de la cual se obtiene un mosto para su fermentación alcohólica, y posteriormente se realizan al menos dos destilaciones donde se recupera el Etanol obtenido y los compuestos volátiles que le



propiciarán la identidad a la bebida. Una correcta destilación permitirá recuperar Etanol para un rendimiento adecuado, así como la diversidad y concentración correcta de compuestos aromáticos. (Universidad Iberoamericana, 2013)

#### 3.1.4.4 Combustible

Más del 97 por ciento de la gasolina contiene etanol, por lo general en una mezcla denominada E10, que está conformada por un 10 por ciento de etanol y un 90 por ciento de gasolina, para oxigenar el combustible y reducir la contaminación del aire. El etanol tiene mayor cantidad de octanos que la gasolina, lo que proporciona propiedades de mezcla de calidad suprema. Los requisitos de cantidad mínima de octanos impiden la anulación del motor y mantienen la facilidad de conducción. (ChemicalSafetyFacts.org, 2008)

El combustible resultante de la mezcla de etanol y gasolina se conoce como gasohol oalconafta. Dos mezclas comunes son E10 y E85, con contenidos de etanol del 10% y 85%, respectivamente.

El etanol también se utiliza cada vez más como añadido para oxigenar la gasolina normal, reemplazando al éter metil tert-butílico (MTBE). Este último es responsable de una considerable contaminación del suelo y del agua subterránea. También puede utilizarse como combustible en las celdas de combustible.

#### 3.1.5 Toxicología.

El etanol actúa sobre los receptores ácido  $\gamma$ -aminobutírico de tipo A (GABA<sub>A</sub>) como modulador alostérico positivo aumentando el flujo de iones transmembrana lo que induce a un estado de inhibición neuroquímica (efecto ralentizador). Produce efectos similares a las benzodiazepinas y los barbitúricos, que actúan sobre el mismo receptor, aunque en sitios distintos. Esta semejanza incluye el potencial adictivo, que también es similar.

El etanol puede afectar al sistema nervioso central, provocando estados de euforia, desinhibición, mareos, somnolencia, confusión, ilusiones (como ver doble o que todo se mueve de forma espontánea). Al mismo tiempo, baja los reflejos. Con concentraciones más altas ralentiza los movimientos, impide la coordinación correcta de los miembros, pérdida temporal de la visión, descargas eméticas, etc. En ciertos casos se produce un incremento en la irritabilidad del sujeto intoxicado como también en la agresividad; en otra cierta cantidad de individuos se ve afectada la zona que controla los impulsos, volviéndose impulsivamente descontrolados y frenéticos. El consumo de grandes dosis de etanol causa embriaguez (intoxicación alcohólica), que puede provocar resaca una vez se han terminado los efectos. Según la dosis y la frecuencia con que se consuma, el etanol puede causar coma etílico, pérdida de conocimiento, una parálisis respiratoria aguda o incluso la muerte. Como el etanol perjudica las habilidades cognitivas, puede incitar a comportamientos

temerarios o irresponsables. La toxicidad del etanol es causada en gran medida por su principal metabolito, el acetaldehído y su metabolito secundario, el ácido acético.

### **3.2 Bioetanol.**

El etanol es un combustible que puede producirse a partir de un gran número de plantas, con una variación, según el producto agrícola, del rendimiento entre el combustible consumido y el generado en dicho proceso. Este etanol, conocido como bioetanol, está sujeto a una fuerte polémica: para unos se perfila como un recurso energético potencialmente sostenible que puede ofrecer ventajas medioambientales y económicas a largo plazo en contraposición a los combustibles fósiles, mientras que para otros es el responsable de grandes deforestaciones y del aumento del precio de los alimentos, al suplantar selvas y terrenos agrícolas para su producción,<sup>1</sup> dudando además de su rentabilidad energética.<sup>2</sup>

El bioetanol tiene las mismas características y composición química que el etanol ya que se trata del mismo compuesto. La diferencia radica en su proceso de producción. El bioetanol ha de ser obtenido desde biomasa, no pudiendo obtenerse del petróleo. Todos los licores alcohólicos que proceden de la fermentación del azúcar de alguna planta se pueden denominar como bioetanol.

Debido al aumento de las medidas tomadas para controlar las emisiones totales de gases con efecto invernadero, la utilización de este alcohol como combustible para el transporte por carretera está creciendo muy rápido. Un análisis del ciclo de vida completo de este producto como combustible muestra como las emisiones generadas en el proceso de producción del combustible y las de operación son compensadas por las fijadas en el cultivo durante su crecimiento.

Aún están pendientes estudios claros acerca de las emisiones de este combustible en la operación. Es posible que contaminantes orgánicos como el benceno o algunos aldehídos aumenten, por lo que es necesario estudiar su impacto en la salud humana.

El etanol se obtiene fácilmente del azúcar o del almidón en cosechas de maíz y caña de azúcar, entre otros. Sin embargo, los actuales métodos de producción de bio-etanol utilizan una cantidad significativa de energía en comparación con la energía obtenida del combustible producido. Por esta razón, no es posible sustituir enteramente el consumo actual de combustibles fósiles por bio-etanol.

### **3.3. OBTENCIÓN DE ETANOL POR FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.**

La fermentación es un término general, que indica la degradación aeróbica o anaeróbica de un substrato orgánico a diversos productos, por la acción de levaduras y algunas bacterias que producen enzimas para realizar dicha función y obtener energía en forma de ATP.

La degradación anaeróbica es quizá la más antigua, puesto que los organismos vivos aparecieron en una tierra primitiva, la cual era carente de oxígeno (Lehninger, 1997)

Existen muchas clases de fermentaciones, dependiendo de: el tipo de organismo que las produce, del substrato, o incluso de las condiciones impuestas, tales como pH o el abastecimiento de oxígeno.

Una de las más importantes y mejor conocidas es la fermentación alcohólica, la cual es una biorreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono mediante la siguiente reacción química.

Las principales responsables de esta degradación son las levaduras. *Cándida Utilis*, es una de las especies de levadura usada con mayor frecuencia. A nivel estequiométrico, esta reacción parece ser sencilla, pero la secuencia de transformaciones para degradar la glucosa hasta dos moléculas de alcohol y dos de dióxido de carbono es un proceso muy complejo, puesto que al mismo tiempo la levadura debe utilizar la glucosa y otros nutrientes adicionales para poder reproducirse. (Vazquez & Dacosta, 2007)

El rendimiento estequiométrico teórico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de dióxido de carbono por 1 gramo de glucosa.

En realidad, es difícil obtener este rendimiento por que como se mencionó anteriormente la levadura utiliza glucosa para la producción de otros metabolitos indispensables para su crecimiento y desarrollo. El rendimiento experimental varía entre el 90 y el 95 % del teórico, y en la industria varia del 87 al 93 % del teórico (Vazquez & Dacosta, 2007)

Puesto que gran cantidad de residuos que contienen carbohidratos de precio muy reducido, pueden aprovecharse en la fabricación de etanol; este tipo de fermentación a escala industrial ha sido usada años atrás por la humanidad para la elaboración de cerveza, vinos y en general bebidas alcohólicas y en la actualidad se le está dando un valor agregado a la producción de etanol para ser utilizado como biocombustible.

La fermentación alcohólica industrial típica es esencialmente un proceso que se produce en un biorreactor, mediante el cual determinados substratos son transformados mediante la reacción microbiana en etanol, dióxido de carbono y biomasa. Estos contenedores son herméticos y permiten retirar mediante canalizaciones apropiadas el dióxido de carbono resultante.

El éxito de una buena fermentación depende de la eficacia del tratamiento preliminar: concentración del azúcar, pH y temperatura óptimos; la adición de sustancias nutritivas al mosto, contaminación por otros microorganismos, empleo de un organismo resistente a



altas concentraciones de alcohol, mantenimiento de condiciones anaerobias y la inmediata destilación del producto fermentado (Prescott Cate & Cecil Gordon, 1992)

La fermentación de tipo industrial está enfocada, en aumentar la eficiencia de los birreactores, con el fin de obtener mejores resultados en cuanto a productos, empleando teorías de control, en las variables que determinan la eficiencia del proceso, como son el calor, la temperatura, contaminaciones, pH, niveles de alcohol, concentraciones del sustrato, biomasa producida entre otras (Biocombustibles, 2007).

## **2.2.1 Condiciones que medir y controlar en el proceso de fermentación**

### **3.3.1.1 Temperatura.**

La temperatura afecta de manera notable en el crecimiento microbiano, debido a que los microorganismos tienen un rango restringido de temperatura para su crecimiento.

### **3.3.1.2 pH.**

El pH tiene una gran influencia en los productos finales del metabolismo anaerobio, por lo tanto, es importante tener un control sobre esta variable durante el desarrollo del proceso de fermentación puesto que los microorganismos poseen un pH óptimo en el cual tienen mayor velocidad de crecimiento y rendimiento.

### **3.3.1.3 Nutrientes.**

Un medio de cultivo debe de tener todos los elementos necesarios para el crecimiento microbiano, para esto se debe tener en cuenta los requerimientos nutricionales del microorganismo con el cual se va a trabajar.

### **3.3.1.4 Aireación.**

La ausencia o presencia de oxígeno permite una selección tanto del microorganismo como de los productos de este. Cuando el cultivo se realiza en presencia de oxígeno la fermentación se denomina aeróbica y cuando este carece de oxígeno se denomina anaeróbica. Si la fermentación es anaeróbica, la mayor parte del carbono se emplea como energía y solo el 2 % se asimila como material celular. *Candida Utilis* es una levadura que posee alta actividad metabólica, por lo que en un proceso fermentativo en fase aerobia se caracteriza por la producción de biomasa y en fase anaeróbica generalmente por la producción de etanol.

### **3.3.1.5 Productividad.**

La productividad se define como la producción de biomasa por unidad de volumen, por unidad de tiempo de cultivo, dado en concentración de biomasa (g/L) en función de tiempo (h).

(Garzon & hernandez, 2009)

## **2.2.2 Limitantes de la fermentación**

### **3.3.2.1 Concentración de alcohol.**

Las levaduras, presentan cierta resistencia a las concentraciones de alcohol que se producen durante la fermentación, debido a que el etanol, inhibe el transporte de D-xilosa, amonio, glicina y algunos aminoácidos, así como afecta la función y estabilidad de algunas enzimas citoplasmáticas como la hexoquinasa, debido a que, a concentraciones críticas de etanol, se presenta la formación de un complejo hexoquinasa-etanol el cual puede detener la reacción glucosa a glucosa-6 fosfato.

En conclusión, la tolerancia al alcohol depende de la habilidad de la célula para exportar el etanol del interior al medio externo, un proceso que depende de la composición de la membrana y de la fluidez de esta.

La célula modifica la composición en ácidos grasos de la membrana para minimizar los efectos de la fluidez que produce el etanol, de la misma manera la adaptación de las levaduras al etanol también obedece a una modificación de la composición lipídica de las membranas debido básicamente a un enriquecimiento de las mismas en esteroides y ácido grasos de cadena larga, de esta manera para las levaduras poder adaptarse a altas concentraciones de alcohol debe existir un aumento del contenido de ácidos grasos insaturados con respecto a los saturados y un aumento en la longitud de las cadenas carbonadas de los ácidos grasos (Tomass, 2004)

### **3.3.2.2 Acidez del sustrato.**

El pH es un factor limitante en el proceso de la fermentación debido a que las levaduras se ven afectadas por el ambiente en el cual se desarrollan es decir alcalino o ácido. Las levaduras tienen rango óptimo de pH que va desde 3.5 hasta 5.5.

En el proceso de fermentación, el pH tiende a disminuir debido a la producción de ácidos, formados al tomar los nitrógenos de los aminoácidos perdiendo su carácter anfótero. En los procesos industriales, se hace uso de soluciones tampón para mantener niveles óptimos de acidez (Rios del Risco, Fajardo, & Pérez M., 2005)

### **3.3.2.3 Concentración de Azúcares.**

Las concentraciones altas de azúcares afectan los procesos de osmosis dentro de la membrana celular, el rango óptimo de concentración de azúcar es de 10 a 18%, puesto que a concentraciones de 22% las levaduras empiezan a tener problemas en su proceso de respiración celular (Rios del Risco, Fajardo, & Pérez M., 2005)

#### **3.3.2.4 Temperatura.**

Las levaduras son microorganismos mesófilos, por lo tanto, su temperatura no puede sobrepasar los 50°C, puesto que a esta temperatura o temperaturas superiores se produce su muerte. Por lo tanto, debido a que la fermentación es un proceso exotérmico, se debe mantener en el mismo un control de temperatura para mantener la temperatura en su valor óptimo que es de 30 °C.

#### **3.3.2.5 Ritmo de crecimiento de las cepas.**

Durante la fermentación las cepas crecen en número debido a las condiciones favorables que se presentan en el medio, esto hace que se incremente la concentración de levaduras.

#### **3.3.2.6 Materias primas.**

El etanol puede obtenerse a partir de cualquier azúcar o polisacáridos. En general la materia prima puede clasificarse en tres grupos (Biocombustibles, 2007)

#### **3.3.2.7 Fuentes con alto contenido de azúcares.**

Como lo son azúcar de caña, remolacha, melazas y jugos de fruta. Son materias primas que poseen un alto contenido de azúcares simples y fermentables, como la glucosa, la fructosa, la galactosa y la sacarosa, entre otros. La ventaja de utilizar este tipo de fuentes consiste en que no es necesario realizar tratamientos previos para obtener los azúcares fermentables, puesto que estos ya se encuentran presentes. (Garzon & hernandez, 2009)

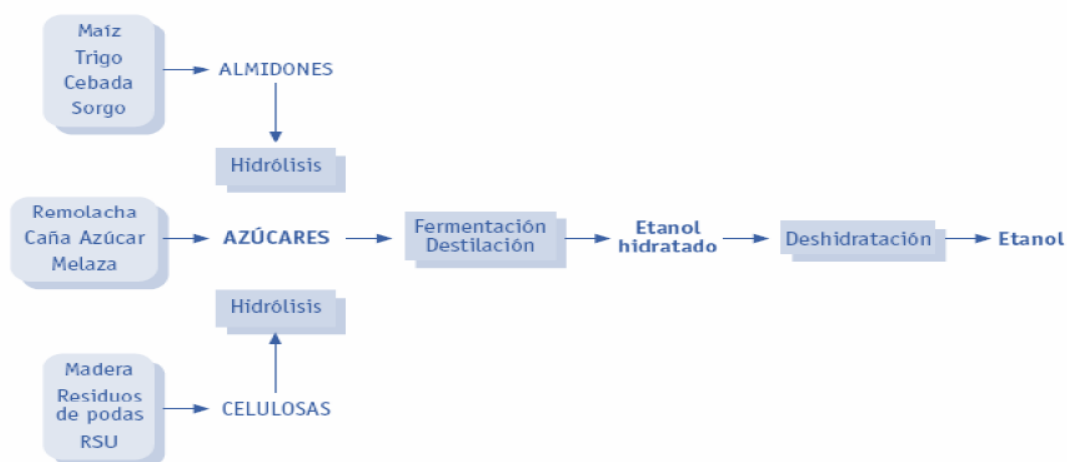
#### **3.3.2.8 Fuentes con alto contenido de almidón.**

Como por ejemplo el maíz, malta, cebada, avena trigo, arroz, sorgo y otros. Estas fuentes deben ser tratadas previamente para obtener los azúcares fermentables. En el caso de los cereales, estos deben someterse previamente a un proceso de hidrólisis del almidón, con el fin de romper este biopolímero en azúcares fermentables que estén disponibles para los microorganismos encargados de la fermentación alcohólica. (Garzon & hernandez, 2009)

#### **3.3.2.9 Fuentes ricas en celulosa.**

Como la madera, residuos de pasta y el papel. Las materias primas con alto contenido de celulosa son las fuentes más abundantes de biomasa a nivel global, y su uso ha tenido un creciente interés global; sin embargo, la compleja composición química de estas fuentes ha planteado retos tecnológicos que aún no han podido ser satisfactoriamente superados. La clasificación de las materias primas se ilustra en la Figura 1.

*Ilustración 1. Materiales Primas utilizadas para la producción de etanol*

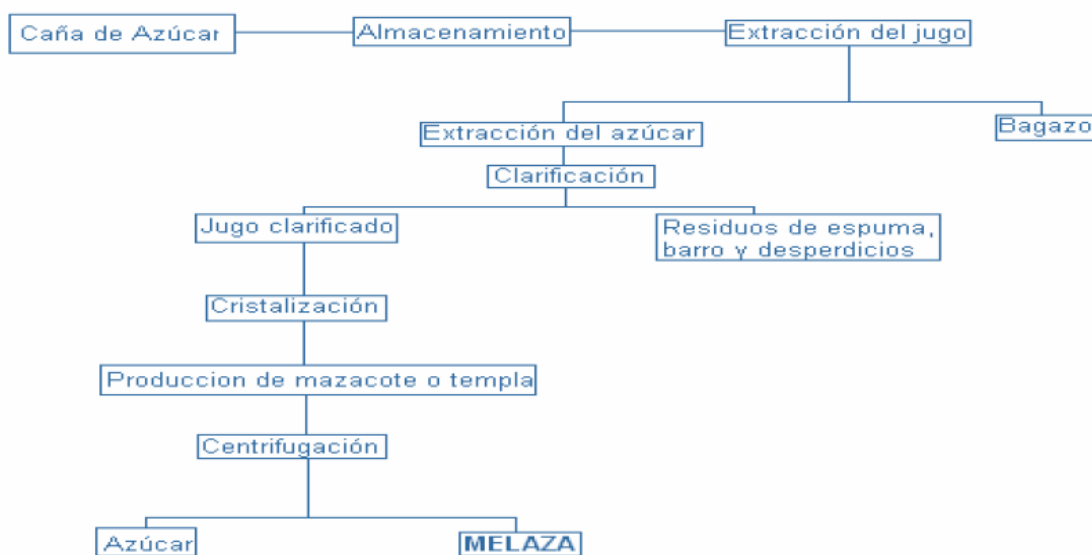


(Biocombustibles, 2007)

### 2.2.3 Etanol a partir de melaza.

**Obtención de la melaza.** La melaza se obtiene como subproducto final de la elaboración del azúcar de caña en la figura 2 se muestra un cuadro resumido de su obtención.

*Ilustración 2. Proceso de Obtención de la Melaza*



(Fajardo C. & Sarmiento F., 2008)

**Composición de la melaza.** La composición de la melaza es muy heterogénea y puede variar considerablemente dependiendo de la variedad de la caña de azúcar, suelo, clima, periodo de cultivo, de la operación de la fábrica, sistema de ebullición del azúcar, tipo y capacidad de los evaporadores, entre otros. Por otro lado, la melaza de caña se caracteriza por tener grados Brix o sólidos disueltos entre 68 y 75 % un pH de 5.0 a 6.1 (Fajardo C. & Sarmiento F., 2008)

*Tabla 1. Composición de la melaza*

Constituyentes Principales	Componentes	Porcentaje en peso (% p/p)
Agua	Agua	17-25
Azúcares	Sacarosa Glucosa Fructosa Otras sustancias reductoras	30-40 4-9 5-12 1-4
Otros carbohidratos	Gomas, almidón, pentosanos, Ácidos urónicos, D-manitol y otros.	2-5
Cenizas	Carbonatos bases: K <sub>2</sub> O CaO MgO Na <sub>2</sub> O Ácidos: SO <sub>3</sub> Cl P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> SiO <sub>2</sub>	7-15 30-50 7-15 2-14 0.3-9 7-27 12-20 0.5-2.5 1-7
Compuestos nitrogenados	Proteína bruta Proteína verdadera Aminoácidos: ácido aspártico y glutámico	2.5-4.5 0.5-1.5 0.3-0.5
Ácidos no nitrogenados	Acido aconítico, cítrico, malico, oxálico, glicólico Mesaconico, succínico, fumárico, tartárico	1.5-6 0.5-1.5
Ceras, esteroides y lípidos		0.1-1
Vitaminas	Vitamina A, Biotina, niacina, ácido pantoténico, riboflavina, tiamina.	Cantidades variables

(Meade P., 1986)

La gama amplia de las melazas que salen de las centrifugas debe ser de 85 a 92 grados Brix, lo cual equivale a aproximadamente 77 a 84 sólidos por desecación.

**Utilización comercial de la melaza.** La melaza es el subproducto de la fabricación o refinación del azúcar crudo. Nutricionalmente presenta un altísimo contenido en carbohidratos además de vitaminas del grupo B y abundantes minerales, entre los que destacan el hierro, cobre y magnesio. Su contenido de agua es bajo.

La norma ICONTEC 587 de 1994, define como miel fina o melaza (no cristizable) al jarabe líquido denso o viscoso, separado de la misma masa cocida final y de la cual no es posible cristalizar más azúcar por métodos usuales (Fajardo C. & Sarmiento F., 2008)

Su principal uso es como suplemento energético para la alimentación de ganado por su alto contenido de azúcares y su bajo costo en algunas regiones, aunque el precio de la melaza se ha incrementado en los últimos años, en más del 122% debido a su utilización como sustrato en la producción de etanol (Meade P., 1986) no obstante, una pequeña porción de la producción se destina al consumo humano, empleándola como endulzante culinario, producción de bebidas como el ron, producción de ácido butírico y acetona y elaboración de levadura de melaza (Meade P., 1986)

*Tabla 2. Aprovechamiento de la melaza de caña.*

UTILIZACIÓN	GENERALIDADES
<b>Alimentos</b>	Alimentación rica.
<b>Animales</b>	Alimentación menos rica: desecados sobre pulpas, mezcla de diversos alimentos, pulverizados de forrajes, suplemento de ensilajes.
<b>Recuperación de líquidos desazucarados</b>	Lejías finales como alimento animal y para la obtención de aminoácidos. Vinazas para la obtención de ácido glutámico.
<b>Fermentación</b>	Levaduras para panificación Levaduras para alimentación humana y animal: extractos e hidrolizados de levadura, fuente de enzimas, vitaminas y ácido nucleicos. Además, es el sustrato utilizado en la producción de proteína unicelular. Grasas de levadura Alcohol etílico Productos colaterales de fermentación alcohólica.

(Fajardo C. & Sarmiento F., 2008)

#### 2.2.4 Tratamiento previo de la melaza antes de la fermentación

. Antes de realizar el proceso de fermentación alcohólica, es necesario someter la melaza a tratamientos previos para acondicionarla. (Garzon & hernandez, 2009)

**Esterilización.** Las melazas pueden contener microorganismos que pueden ser nocivos para la fermentación. El más común es la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, el cual polimeriza las moléculas de sacarosa en dextranos no fermentables (Biocombustibles, 2007)

**Dilución.** La altísima concentración de azúcares y sales presentes en las melazas impiden que los microorganismos puedan fermentarlas, debido a la gran presión osmótica que generan sobre sus paredes celulares; asimismo, las melazas son altamente viscosas, y su manipulación es difícil en estas condiciones. Por estas razones, es necesario diluir las melazas; para ello, se les agrega agua, hasta obtener diluciones de 25° Brix o menores; a valores mayores se tiene el riesgo de inicios lentos de fermentación y contaminación bacteriana (Biocombustibles, 2007)

**Adición de nutrientes.** En ocasiones es necesario añadir algunos elementos adicionales, con el fin de complementar los nutrientes necesarios para los microorganismos que realizarán la fermentación. Para las melazas de caña de azúcar, es necesario añadir algo de nitrógeno y fósforo. Para producción de alcohol carburante, el nitrógeno puede añadirse en forma de urea. Los requerimientos en fósforo pueden cubrirse con fosfato de diamonio, con la correspondiente disminución de urea o la fuente de nitrógeno usada. (Garzon & hernandez, 2009)

### 2.2.5 Bioquímica de la fermentación alcohólica.

La fermentación alcohólica comprende toda una serie de reacciones bioquímicas a través de las cuales algunos microorganismos, por medio de un conjunto de enzimas producidas por ellos (o añadidas artificialmente), realizan una transformación de azúcares para convertirlos en etanol, dióxido de carbono y energía (Biocombustibles, 2007)

La fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico exotérmico el cual libera moléculas de ATP, las cuales son necesarias para el funcionamiento metabólico de las levaduras. Debido a que el proceso es anaeróbico, la respiración celular de la cadena del ADP en ATP queda completamente bloqueada, siendo la única fuente de energía para las levaduras la glicólisis, la cual produce moléculas de ATP mediante la fosforilación a nivel de sustrato. En el balance total energético se generan 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa.

Microorganismos utilizados en la fermentación alcohólica.

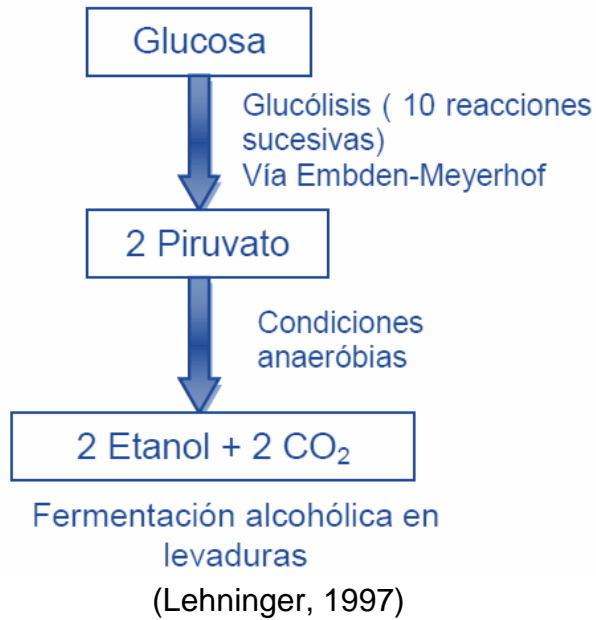
Tradicionalmente, los microorganismos más empleados en la obtención de etanol son las levaduras, aunque existen varios tipos de bacterias y hongos que también son capaces de sintetizarlo en cantidades considerables. La fermentación alcohólica se realiza en ausencia de oxígeno, excepto durante el tiempo de inoculación, durante el cual se insufla una pequeña cantidad para permitir un crecimiento limitado de los microorganismos para que estos superen su fase de latencia y entren en la fermentación ya en la fase exponencial (Biocombustibles, 2007)

En el caso de las levaduras, cuando éstas toman el azúcar del medio, se inicia toda una serie de reacciones intermedias, conocidas como la ruta glicolítica o ruta Embden-Meyerhof. A través de este proceso bioquímico, las levaduras rompen los azúcares en energía, intermediarios útiles para el crecimiento de las células, y una gran cantidad de productos finales (etanol, dióxido de carbono y calor), los cuales son excretados por las mismas. (Garzon & hernandez, 2009)

**Levaduras.** Las levaduras empleadas para llevar a cabo el proceso de fermentación alcohólica requieren, que la glucosa sea catabolizada mediante la glucolisis o ruta de Embden-Meyerhof, para obtener el piruvato el cual posteriormente por la acción de enzimas específicas, se convierte anaeróbicamente en etanol y dióxido de carbono.

La glicolisis es una ruta catabólica en la cual la glucosa es convertida a dos moléculas de piruvato, las cuales, dependiendo de las condiciones, pueden tomar rutas diferentes, **en la figura 3**, se muestra la ruta que toma el piruvato en condiciones anaerobias.

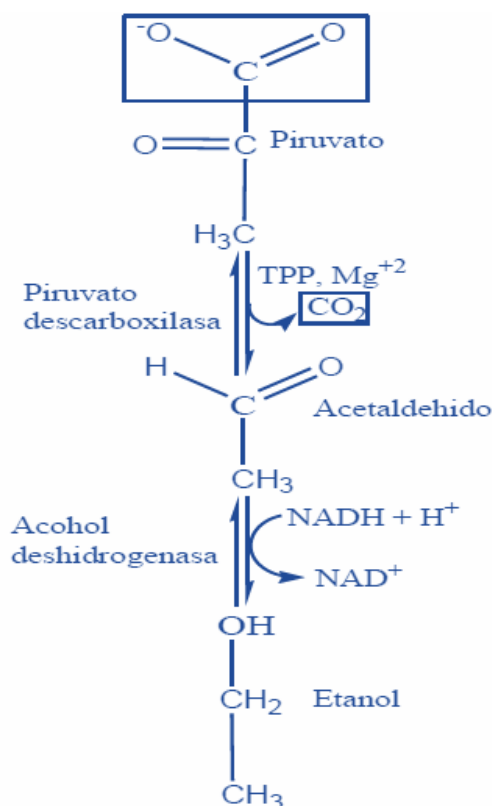
*Ilustración 3. Ruta catabólica del piruvato obtenido mediante glicólisis.*



Posteriormente el piruvato se descarboxilasa debido a la presencia de la enzima piruvato descarboxilasa que se encuentra en todos los organismos que metabolizan alcohol, para formar acetaldehído el cual se reduce a etanol por la presencia de NADH como agente reductor, a través de la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa, la cual está en todos los organismos capaces de dar lugar a la fermentación alcohólica. La conversión del piruvato a etanol se muestra en la **figura 4**.



Ilustración 4 conversión del piruvato a etanol



(Lehninger, 1997)

En las levaduras, la producción de etanol se realiza principalmente sobre sustratos sacarosados, jugos de remolacha, jarabe, aguas residuales o melaza de azúcar. Las principales características que debe tener una cepa para la producción de alcohol industrial son:

Capacidad de fermentar rápidamente el medio y producir etanol con un rendimiento próximo al rendimiento teórico.

Pocos exigentes en factores de crecimiento, para evitar la adición de vitaminas a los medios industriales. Tener una buena tolerancia al etanol. Buena producción de ésteres y glicerol.

Las levaduras más utilizadas y estudiadas para la producción de alcohol son *Saccharomyces cerevisiae* y *Cándida utilis* (Madigan T., Martinko M., & Parker, 2003) La transformación de piruvato a etanol y dióxido de carbono ocurre de la misma forma que para levaduras.

### 2.3 CÁNDIDA UTILIS.

es una levadura importante en la industria alimentaria y ampliamente estudiada desde que se concibió el uso de biomasa microbiana para la alimentación. Tiene la gran

característica de degradar diferentes sustratos orgánicos, en particular ha llamado la atención el que utilice compuestos orgánicos celulósicos como única fuente de carbono. Otra de sus propiedades es la producción extracelular de enzimas importantes para la industria, así como el alto contenido de grasas, proteína y vitaminas, en especial de complejo b. (Covarrubias)

La celulosa es la sustancia orgánica más abundante en la tierra. La mayoría de los desechos agrícolas y forestales contienen entre un 20% y un 50% de celulosa y entre un 50% y un 80% de hemicelulosa y lignina en base seca. La celulosa es un polímero en forma de micelas, compuesto de subunidades de D-glucopiranosas. Dos subunidades forman celobiosa la de tres celotriosa, por eso es por lo que se encuentra asociada con otros polisacáridos los cuales son formas intermedias de su síntesis o degradación. Cuando la levadura crece en un medio celulósico se cree que genera enzimas hidrolíticas degradadoras de celulosa. Se han conocido 5 tipos de endoglucanasas y 1 de exoglucanasasa que atacan a diferentes partes de la molécula de celulosa produciendo cadenas cortas.

Levadura *torula* se conoce generalmente como la levadura nutricional y clasificados en *Candida utilis* (*Pichia jadinii*). *Torula* es un hongo cosmopolita en ciernes y en la naturaleza. Fue descrita por primera vez por Persoon en 1794. Levadura *torula* (en forma seca) es permitido por la FDA de EE. UU. para la adición directa a los alimentos para el consumo humano. La producción comercial de levadura *torula* se inició en Alemania durante la Primera Guerra Mundial del subproducto de celulosa y lignina industria de productos metabolizado por *S. Cerevisiae*. En medio de la actual demanda de levadura *torula* para aplicaciones en alimentos, los fabricantes de alimentos en EE. UU. y otros países están produciendo primario levadura *torula* crecido la utilización de las existencias de azúcar de alimentación asegurar levadura pura y consistencia lote tras lote. Se pasteuriza y seca para producir un fino, ligero color marrón grisáceo polvo. La calidad de la levadura *torula* es muy dependiente de los sustratos y los métodos de producción utilizados.

### **2.3.1 Funciones y usos**

Se utiliza principalmente en la producción de proteína unicelular, debido a su capacidad de utilizar una variedad de fuentes de carbono, como la paja de arroz, almidón de papa en aguas residuales, aceite de aguas residuales y melaza. También se ha usado como soporte para producir varios productos químicos, tales como el glutatión, monelina y el acetato de etilo. (Mora L. & Bravo R., 2014)

Es una levadura que tiene una alta tasa de crecimiento, que ninguna especie ha logrado superar, y que requiere de un sustrato rico en azúcares o fuentes de carbono, para su crecimiento o cultivo debido a su capacidad de utilizar una variedad de fuentes de

carbón rápidamente; es rica en proteína y vitaminas del complejo B, apropiada para la alimentación animal y humana.

Funciona como regulador de animales micro ecológicas equilibrio intestinal, mejorar la digestibilidad de los piensos, mejorar la inmunidad del animal. Además, debido a *Candida utilis* células son ricos en vitamina B y la proteína, sino que también proporcionan una porción deseada de la nutrición animal. Ampliamente usado como saborizante en alimentos procesados y alimentos para mascotas. Se produce a partir de azúcares de la madera, como un subproducto de la producción de papel. Se pasteuriza y se seca por pulverización para producir un fino, ligero color marrón grisáceo polvo con un olor ligeramente a levadura y suave, ligeramente sabor a carne. Usado como saborizante cárnico junto con *Kluyveromyces fragilis* y *Saccharomyces cerevisiae*. En algunos casos también interviene en la fermentación del kumis. Es un microorganismo productor de lactasa comercial. *Torula* encuentra un uso aceptado en Europa y California para el control biológico de las moscas de oliva. Cuando se disuelve en agua, que sirve como un atrayente alimenticio, con o sin señuelos feromona adicionales, en trampas McPhail y OLIFE, que hunden a los insectos. En los ensayos de campo en el condado de Sonoma, California, adornos masivos daño reducido a un promedio del 30% en comparación con casi el 90% en los controles no tratados.

### **3.4.2 Funciones y usos**

Debido al incremento de la población mundial es necesario aumentar la calidad de los alimentos consumidos, por tal razón existen estudios orientados a encontrar nuevas fuentes proteicas. Las proteínas para consumo humano se obtienen principalmente de animales y algunos vegetales como los cereales (Gualtieri, Villalta, Díaz, Medina, & Lapena, 2007)

Como alternativa de fuente proteica se considera a la proteína unicelular; que es la biomasa microbiana obtenida de algas, bacterias, levaduras y hongos filamentosos cultivados en condiciones fermentativas apropiadas y controladas que garanticen una adecuada tasa de crecimiento, por medio del aprovechamiento de sustratos de bajo costo, compuestos o enriquecidos con carbono, nitrógeno y fósforo (Chacón, 2004).

Las fuentes proteicas no convencionales se pueden obtener de una gran variedad de microorganismos que contienen una elevada concentración de proteínas en su composición y son capaces de reproducirse en medios muy variados (Pedraza, 2000) La producción de proteína unicelular tiene importantes ventajas sobre otros recursos proteicos, tales como el corto tiempo de producción y que no altera las condiciones del ambiente (Chacón, 2004)

Entre los sustratos para la producción de biomasa en que pueden reproducirse los microorganismos se encuentran algunos desechos agroindustriales ricos en carbohidratos (Ferrer, Davalillo, Chandler, & Páez, 2004) tales como los extractos obtenidos de desechos de hojas de col o repollo (*Brassica oleracea* L.), que mostraron ser excelentes para el desarrollo de *Cándida utilis*, *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomices cerevisiae* (Choi, 2003) También los hidrolizados de residuos de madera de *Eucalyptus globulus* Labill. han permitido la reproducción de *C. utilis* obteniendo hasta un 88 % de proteína (Parajó, Santos, Domínguez, & Vázquez, 2000). Por otra parte, la cachaza, el bagazo y la melaza, se han usado como sustratos para el crecimiento de microorganismos (Ferrer, Davalillo, Chandler, & Páez, 2004) La melaza, es considerada el sustrato más relevante en la elaboración de medios de cultivo a partir de residuos agroindustriales para la producción de proteína unicelular debido a que es un residuo de bajo costo que se genera en gran cantidad.

Las características organolépticas y funcionales de la biomasa microbiana no siempre han sido atractivas para los consumidores y por lo tanto tampoco para la industria alimentaria.

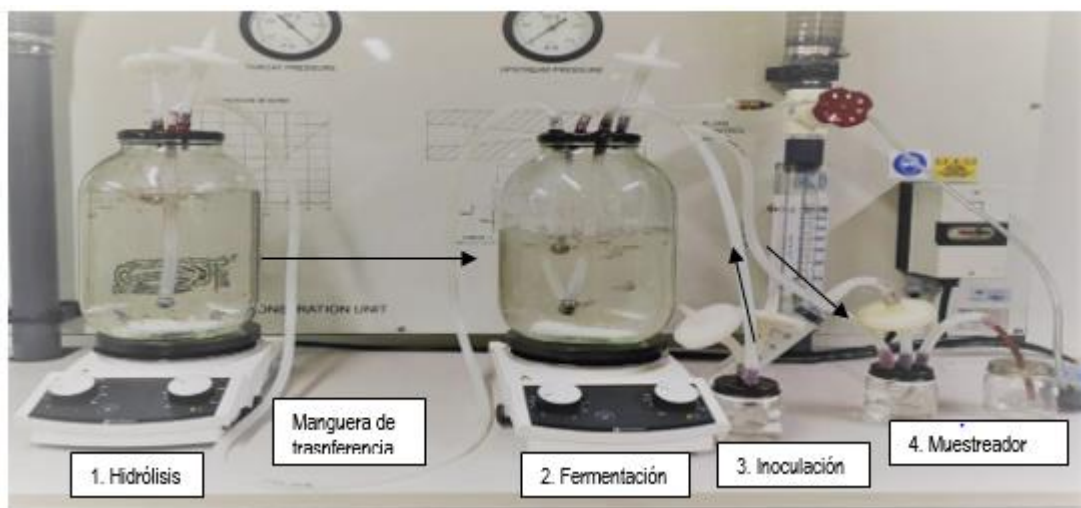
Sin embargo, recientemente los avances en las tecnologías de fermentación y la ingeniería genética han permitido retomar su producción (García & Gómez, 2004) y aunque desde hace décadas se propuso su uso, se encontraron inconvenientes relacionados con la seguridad de su consumo, tales como el alto contenido de ácidos nucleicos (4-6 % en algas, 6-10 % en levaduras, 2.5-6 % en hongos) cuya acumulación en el organismo es dañina para la salud, la presencia de sustancias tóxicas adsorbidas de los sustratos que se utilizan para la obtención de la biomasa, además la digestión lenta de las células microbianas en el tracto digestivo puede causar indigestión y reacciones alérgicas.

Sin embargo, en este trabajo se plantea el potencial de la biomasa microbiana como un aditivo proteico, una vez que se ha sometido a un proceso de purificación para disminuir la cantidad de ácidos nucleicos con el propósito de obtener biomasa de *Cándida utilis* a partir de melaza y disminuir su contenido de ácidos nucleicos, así como comparar su composición química con la de alimentos convencionales.

#### 4. METODOLOGIA

En esta investigación se trabaja el sistema de fermentación piloto trabajado en la fundación universitaria los libertadores por Jeison Cuchimaque, (Cuchimaque, 2018) donde se enlaza el proceso de hidrólisis y de fermentación batch, de forma tal que las condiciones acá modeladas, sean base para fermentaciones alcohólicas con condiciones controladas y reproducibles dentro de un sistema donde el sustrato es la *Eichhornia Crassipes* y la producción del bioetanol la realiza la *Cándida Utilis*. (Ilustración 5)

*Ilustración 5. Modelo teórico a proceso de producción de bioetanol a partir de la biomasa*



Fuente: (Cuchimaque, 2018)



Modelo teórico a proceso de producción de bioetanol a partir de la biomasa Hidrolizada de la *Eichhornia crassipes* en sistemas piloto de fermentación desarrollado en la Fundación Universitaria los Libertadores (Cuchimaque, 2018)

## 4.1 Preparación de la Eicchornia Crassipes “Buchón de Agua”.

### 4.1.1 Extracción.

La extracción de la planta *Eicchornia Crassipes*, fue obtenida del humedal de Engativá (Ilustración 6 y 7) ubicado en la ciudad de Bogotá.

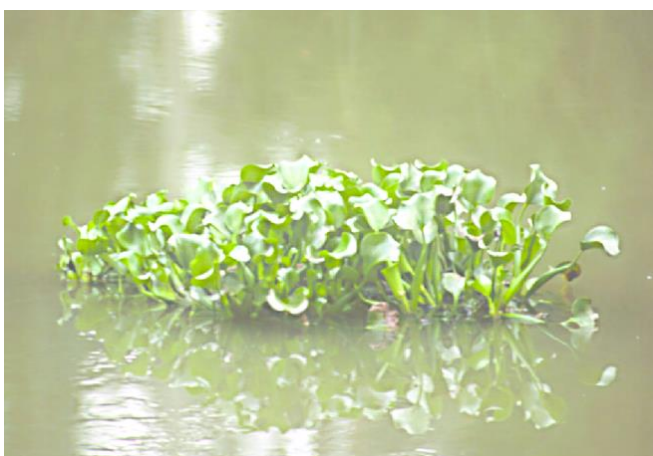
De este humedal se realizó el retiro de 20 plantas, las cuales contaron con un peso aproximado de 10 Kg.

Ilustración 6. Localización Humedal Engativá Bogotá



Fuente: Autores

Ilustración 7. Extracción de Eicchornia Crassipes



Fuente: Autores

### 4.1.2 Secado.

Después de su recolección, las plantas fueron lavadas con agua a baja presión, con el fin de retirar residuos orgánicos que se encuentran en el humedal y que puedan contaminar el





proceso; el segundo paso a realizar es el secado, para este proceso, el buchón se deja secar a temperatura ambiente (Ilustración 8) durante 15 días y se finaliza con un secado en horno a 60°C, con el fin de deshidratar por completo la planta y retirar la mayor cantidad de agua posible, ya que esta planta está compuesta por el 90 % de agua.

*Ilustración 8. Proceso de Secado a Temperatura Ambiente*



*Fuente: Autores*

#### **4.1.3 Triturado.**

Al momento de contar con una planta completamente deshidratada, donde su composición cambia a estado seco el cual permite realizar proceso de triturado; para este procedimiento se implementó un molino de grano, permitiendo un triturado uniforme, el cual al ser triturado pasa a través de una malla o colador con el fin de obtener un grado de 0.8 mm, eficaz para el proceso de Hidrolisis.

## 4.2 Sistema de Hidrolisis

El polvo obtenido de la *Eichhornia crassipes* se somete a una hidrólisis ácida donde se busca romper o descomponer el mayor porcentaje % de polímeros de Lignina y celulosa hasta obtener monómeros o dímeros de glucosa, la cual es usada como sustrato en la fermentación alcohólica. (Cuchimaque, 2018)

La biomasa de *Eichhornia crassipes* triturada obtenida de 80 gr, es agregada al frasco de hidrólisis con agua destilada, se hará reaccionar con el 1% (p / v) de Soda caustica (NaOH) (Ilustración 10) a temperatura de 60°C y agitación de 250 RPM durante 12 horas.

*Ilustración 9. Hidrolisis Acida de Eichhornia Crassipes con NaOH*



*Fuente: Autores*

Para esta primera etapa de hidrólisis, la optimización que radica en el diseño sobre el sello o la tapa permite que sea un proceso contenido y cerrado; sin embargo con un sistema de desfogue que consiste en 2 filtros hidrófobos fabricados en teflón con un poro de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ , permitiendo que los gases del proceso de hidrólisis salgan sin presurizar el sistema pero manteniendo el control a la temperatura constante y sin que entre contaminación externa al sistema alterando el sustrato (Cuchimaque, 2018), posteriormente la biomasa con Hidrolisis acida es lavada con agua para alcanzar el pH del agua.

Posteriormente se agrega ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 3 % (v/v) a temperatura de 60°C, durante 12 horas y agitación de 250 RPM, en este caso la optimización al tipo de sellado evita que la reacción exotérmica que ocurre entre la soda caustica y el ácido sulfúrico afecte al operador del sistema, ya que los filtros permiten nuevamente el desfogue de gases sin perder contención en el mismo. (Cuchimaque, 2018)



*Tabla 3. Muestreo Hidrolisis*

HORA	Tiempo (h)	Ácido Sulfúrico (mL)	pH
12:00 a. m.	0	0	8,91
1:00 p. m.	1	10	7,50
2:00 p. m.	2	12	6,38
3:00 p. m.	3	13,5	5,60
4:00 p. m.	4	15,5	4,80
5:00 p. m.	5	17	4,20
6:00 p. m.	6	18,5	3,65
7:00 p. m.	7	22	3,60
8:00 p. m.	8	22	3,60
9:00 p. m.	9	22	3,57
10:00 p. m.	10	22	3,55

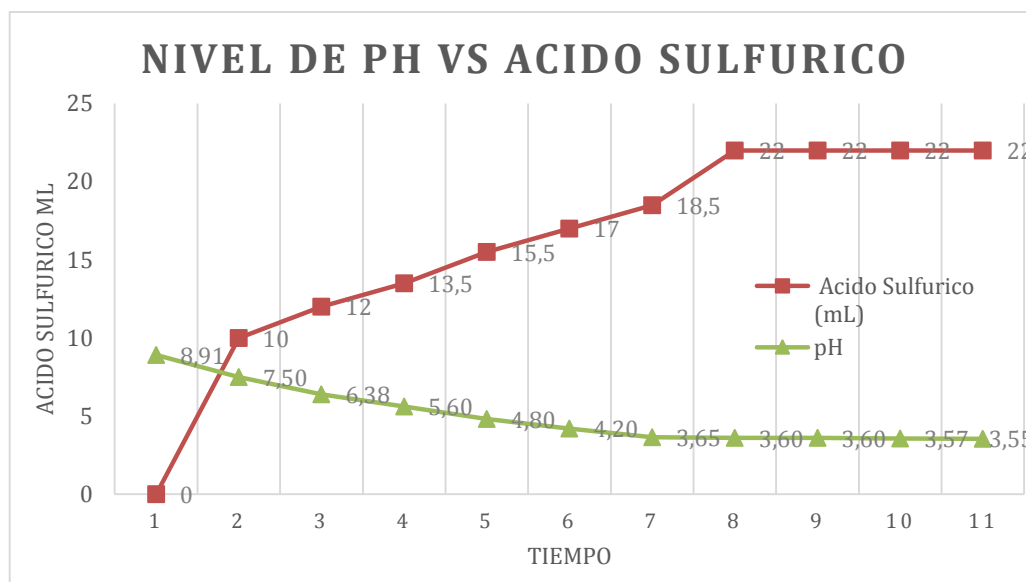
*Fuente: Autores*

Durante este proceso de Hidrolisis, fue realizado un muestreo de cada hora iniciando desde la 1 pm; durante este tiempo se determina que para obtener un pH constante de 3,55 pH, fue necesario la disolución de la *Eichhornia crassipes* en 22 ml de Ácido Sulfúrico (Tabla 3), de esta manera poder lograr romper o descomponer el mayor porcentaje % de polímeros de Lignina.

En la Grafica 1 podemos visualizar el comportamiento obtenido en este sustrato durante una hidrolisis de 12 Horas, logrando la descomposición necesaria.

De igual manera, con el proceso de hidrolisis ejecutado, se logra evidenciar que durante el proceso de ruptura de polímeros Lignina, se logró obtener el aumento de la glucosa (Tabla 3) necesaria para brindar inicio al procedimiento de fermentación.

Grafica 1. Comportamiento del pH con Ácido Sulfúrico



Fuente: Autores

### 4.3 Sistema de Fermentación

Para el diseño del sistema de fermentación piloto fue necesario tener en cuenta las siguientes variables según (Cuchimaque, 2018):

1. El sistema debe ser sellado o contenido de tal forma que evite contaminación que altere la fermentación alcohólica produciendo en lugar de bioetanol ácido láctico o ácido acético.
2. Que posea un sistema de desfogue de gases para permitir la fermentación sin que presurice el sistema y la respiración de la *Cándida Utilis*.
3. Al ser un sistema cerrado se requiere un sistema de muestreo que permita el control sobre el consumo del sustrato y el porcentaje de producción de alcohol.

El diseño y la optimización de este proceso está en la tapa o forma de sellado (ver Figura 11), el cual permite realizar un proceso continuo de fermentación y muestreo sin abrir el sistema y que pierda las condiciones de fermentación, para esto se diseñó una tapa con 3 entradas y 1 salida.

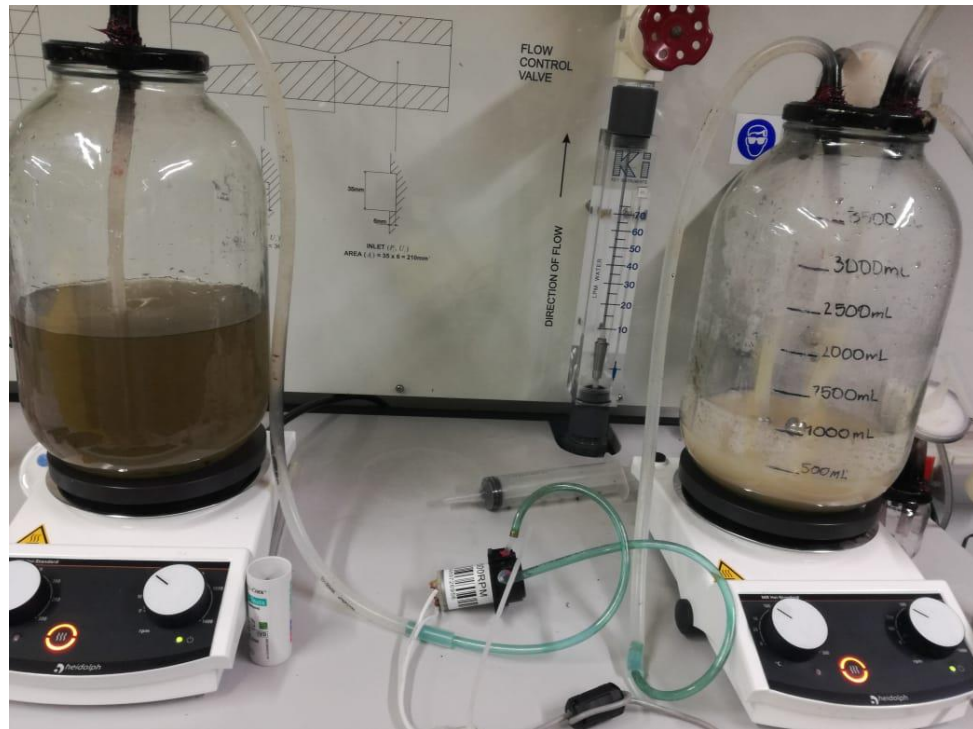
Las entradas corresponden:

1. A la entrada de la transferencia del sustrato hidrolizado de *Eichhornia crassipes* desde el frasco #1 con la ayuda de una bomba peristáltica y de una manguera siliconada. (Cuchimaque, 2018)
2. De una entrada de aireación o burbujeo de aire, que consta de un filtro hidrófobo en teflón de 0,22  $\mu\text{m}$  acoplado a una manguera y a un motor de pecera como sistema de burbujeo



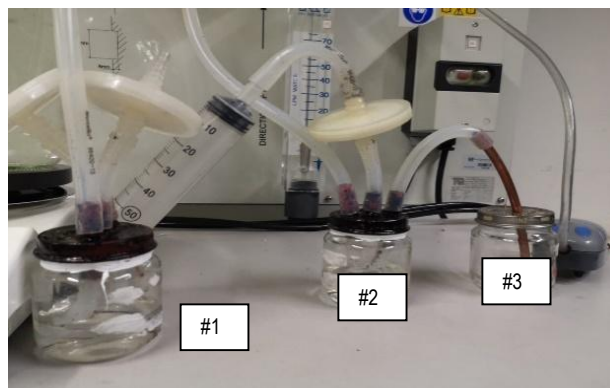
3. Entrada acoplada a un frasco de 100 ml que corresponde a la preparación del inóculo de Cándida Utilis.
4. Y la salida corresponde a un sistema de vacío con una jeringa de 60 ml a un frasco de 100 ml para realizar el muestreo que se requiere para controlar el proceso (ver Figura 12).

*Ilustración 10 Sistema de fermentación piloto*



*Fuente: Autores*

*Ilustración 11 Recipientes de izquierda a derecha  
#1 adición inóculo de microorganismo, #2 sistema  
de vacío para muestreo, #3 frasco de muestra.*



*Fuente: Autores*

Ya con sistema de fermentación armado y optimizado y transferida la hidrólisis del frasco #1 al frasco de fermentación es posible dar inicio a la fermentación en batch, dando las condiciones de agitación y temperatura mencionadas en el punto 4.3.

Para este proceso de fermentación fue necesario en el tarro #2 realizar un preparación de 500 ml de agua con 20 gr de *Cándida Utilis*, con agitación constante de 250 RPM y temperatura de 60°C; después de 1 hora de agitación se verifica temperatura para brindar inicio a la fermentación.

#### **4.4 Control fermentación alcohólica.**

Todo proceso de fermentación debe ser controlado cada periodo de tiempo para determinar los rendimientos del mismo; en este diseño las variables a tener en cuenta fueron: pH, concentración de glucosa (mg/dl) la cual es el sustrato de la fermentación alcohólica y resultado de la hidrólisis, % de alcohol el cual es el producto de interés, y temperatura.

##### **4.4.1 Medición de alcohol.**

La medición y el control al porcentaje de alcohol; el cual es el producto resultado de la fermentación se realizó con un alcoholímetro de amplio rango (0-100%); este instrumento de inmersión fue verificado en una solución de Alcohol etílico el cual contiene 70% y posteriormente medido en el Agua 0% (ver Figura 13 y 14). Para la medición de la producción de alcohol se tomó una muestra de 200 ml de la fermentación cada 1 hora a 2. (Cuchimaque, 2018)

*Ilustración 13 Medición en Alcohol*



*Fuente: Autores*

*Ilustración 12 Medición en agua*



*Fuente: Autores*



#### 4.4.2 Medición de glucosa:

La medición y el control de la glucosa, fue realizada con glucómetro el cual tiene un rango entre 700mg/dl a 40 mg/dl al proceso de hidrolisis y adicional el sustrato generado en la fermentación para la producción del bioetanol.

Para la optimización del proceso de fermentación es importante acotar que la determinación de la eficiencia es cuantos mg de glucosa se transforman en alcohol.

*Ilustración 14 Toma Glucosa a fermentación*



*Fuente: Autores*

En el proceso medición de glucosa, las muestras fueron tomadas en un rango de 8 horas (Ver Tabla 4), donde la primera muestra tomada nos arroja 344 mg/dL y la última muestra tomada a las 8 pm nos arroja 167 mg/dL (ilustración 15); de acuerdo a esta información obtenida, se logró evidenciar que el proceso de fermentación entre la *Eichhornia crassipes* y la *Cándida Utilis* genero los resultados esperados ya que durante las 12 horas de fermentación se logro obtener 2 % grados de Alcohol; en la gráfica 3 y 4 podemos visualizar el comportamiento exponencial en el consumo de la Glucosa y generación de alcohol.

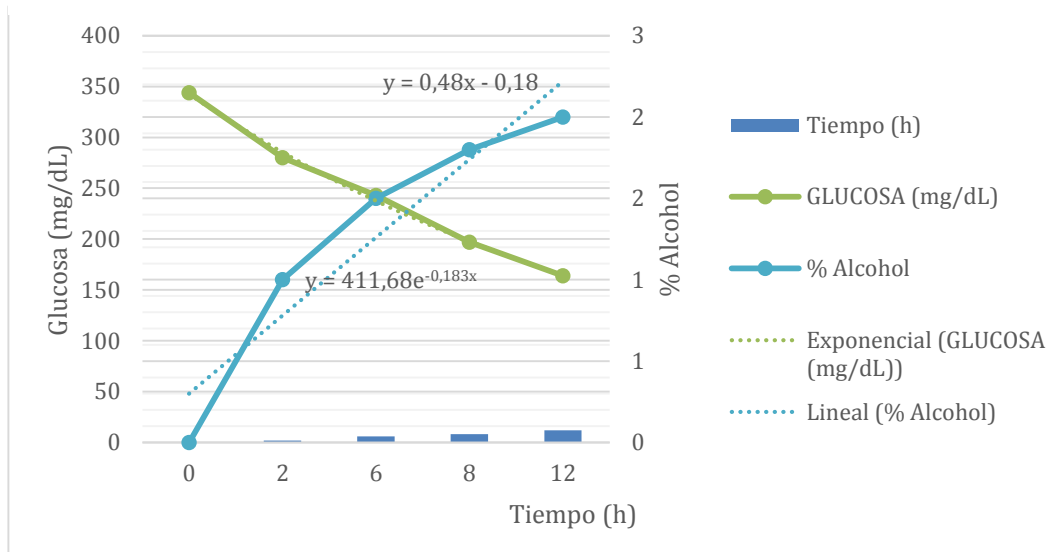


*Tabla 4 Muestra Glucosa vs Alcohol*

HORA	Tiempo (h)	GLUCOSA (mg/dL)	% Alcohol
10:00 a. m.	0	344	0
12:00 p. m.	2	280	1.0
4:00 p. m.	6	243	1.5
6:00 p. m.	8	197	1.8
10:00 p. m.	12	167	2

*Autores*

*Grafica 2 Comportamiento Consumo de Glucosa y generación de Alcohol*



*Fuente: Autores*

#### 4.5 Modelo matemático de producción de bioetanol a través de la fermentación

En esta sección se presentará las ecuaciones más importantes para la transformación de la biomasa hidrolizada de la *Eichhornia crassipes* bioetanol. Este crecimiento de microorganismos son los que van a descomponer el hidrolizado de la *Eichhornia crassipes*. La velocidad específica de crecimiento microbiano fue establecida por Monod en 1942 y se utiliza hasta esta fecha para describir el crecimiento microbiano en un sistema y se representa:

$$t = \frac{Um}{y} \left\{ \left( \frac{Ks}{Xo + YSo} + \frac{1}{y} \right) \ln(Xo + YSo - YS) - \left( \frac{Ks}{Xo + ySo} \right) \ln \frac{SXo}{So} - \frac{1}{y} \ln Xo \right\} \quad (15).$$

Se diseñó un procedimiento de modelación matemática para encontrar la mejor combinación juntando las variables propuestas por (Rittmann y McCARTY, 2000)

donde se utilizaron las variables de U, Um, Ks, q y Y representadas en la siguiente tabla 5.

*Tabla 5 Variables propuestas por (Rittmann y McCARTY, 2000)*

Tasa de crecimiento	U	1/T	0,6
Max tasa de Crecimiento microbiano.	Um	1/T	1,764
Constante mitad	K	mg/L	0,882
Máxima tasa de utilización de sustrato	q	mg/mg*H	9,8
Rendimiento Real de síntesis de células	Y	mg/mg*H	0,6
Máxima tasa de utilización de sustrato	q	mg/mg*H	9,8

*Fuente Modificado: (Rittmann y McCARTY, 2000).*

Se realizaron diferentes escenarios de concentraciones iniciales y finales de Hidrolizado de Eichhornia crassipes (S) y las concentraciones iniciales y finales de la Cándida Utilis (X) calculando el tiempo y máxima productividad de etanol para la construcción de los biorreactores. Que se muestran en la siguiente tabla 6.

*Tabla 6 Parámetros iniciales*

	Representación	Unidades	Escenario
Horas de Tratamiento	H	Horas	12
Hidrolizado de Eichhornia crassipes (Inicial)	So	mg/L	80
Hidrolizado de Eichhornia crassipes (Final)	S	mg/L	20
Cándida Utilis (Inicial)	Xo	mg/L	8
Cándida Utilis (Final)	X	mg/L	18.8

*Fuente Modificado: (Rittmann y McCARTY, 2000).*



*Tabla 7 Datos Obtenidos según variables Rittmann y McCARTY, 2000*

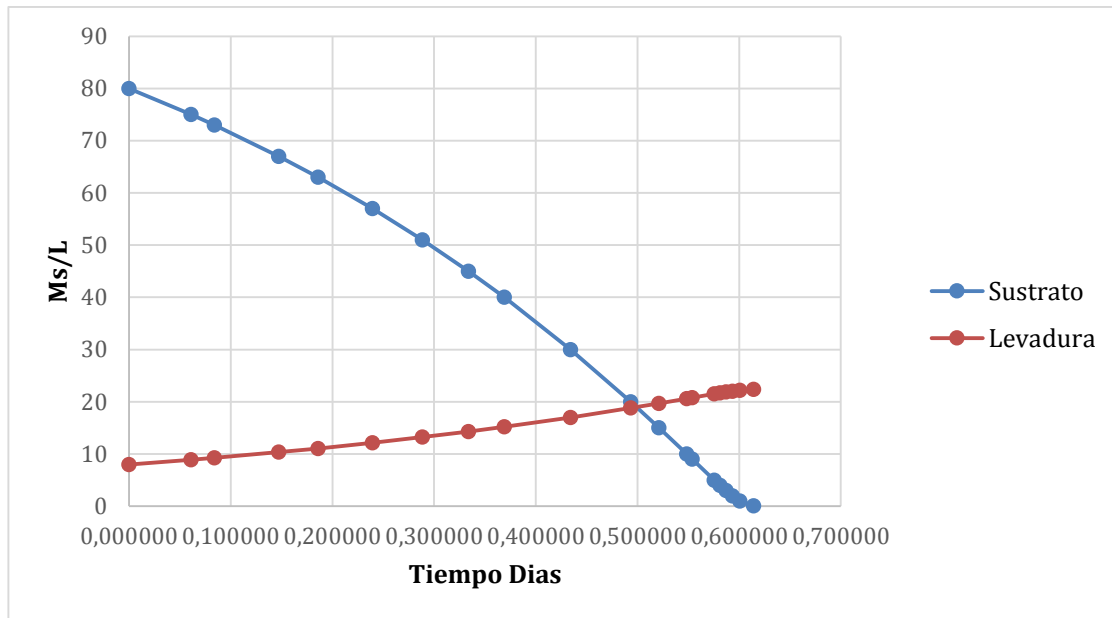
8		
tiempo	Sustrato	Levadura
0,000000	80	8
0,061124	75	8,9
0,083871	73	9,26
0,147196	67	10,34
0,185874	63	11,06
0,239469	57	12,14
0,288571	51	13,22
0,333907	45	14,3
0,369227	40	15,2
0,434278	30	17
0,493365	20	18,8
0,521218	15	19,7
0,548351	10	20,6
0,553741	9	20,78
0,575549	5	21,5
0,581206	4	21,68
0,587082	3	21,86
0,593393	2	22,04
0,600821	1	22,22
0,614220	0,1	22,382

*Fuente: Autores*





*Grafica 3 Comportamiento consumo sustrato vs levadura*



*Fuente: Autores*

Se calculó con la ecuación de monod los tiempos variando la cantidad de sustrato (S) y la cantidad de microorganismos (X); esto se calculó de acuerdo a la ecuación. En la tabla 7 se puede observar un inicio del hidrolizado de *Eichhornia crassipes* para el escenario de 80 mg/L, el biorreactor tendrá 2 Litros de este hidrolizado. Se podría afirmar que un gran porcentaje del sustrato se convierte en alcohol obtenido una rentabilidad del 2 % de Alcohol en 12 horas de fermentación.

En la gráfica 3 podemos observar que a las 12 horas (0.5 días) se establece el punto de equilibrio donde el sustrato pierde por completo la glucosa dentro de su estructura molecular debido al consumo realizado por la levadura en el proceso de fermentación, la cual a partir de este momento se vuelve estable permitiendo la generación de alcohol.

## CONCLUSIONES

Se trabajo con la implementación de un sistema Bach desarrollado en la fundación universitaria los libertadores, donde se logró realizar los procesos de hidrolisis tanto acida como alcalina y el proceso de fermentación del sustrato.

La realización de la Hidrolisis acida en la cepa natural *Eichhornia crassipes* permite romper la estructura molecular gracias al  $H_2SO_4$ , permitiendo generar la base molecular para la producción de alcohol; es indispensable que el proceso de Hidrolisis acida sea cerrado, evitando contaminación aérea y durante un tiempo no menor a 10 horas en agitación constante.

Se logró obtener la producción de alcohol al 2% gracias al proceso de hidrolizacion alcalina y acida que se le realizo a la *Eichhornia crassipes* a través de la fermentación con la cándida *Utilis*.

Partiendo de la investigación realizada, fue posible evidenciar que la *Eichhornia crassipes*, por su fácil acceso dentro de los recursos naturales básicos y su sencillo mantenimiento de producción, adicional a su clasificación como planta invasiva, puede resultar de gran interés para la obtención de etanol, en comparación con otras materias primas. Sin embargo, es escaso el acceso de información acerca de la disponibilidad de estas plantas para avalar estabilidad en la fabricación de combustibles a partir de ésta.

Es posible considerar a la *Eichhornia crassipes* como una opción viable para la producción de combustibles, como un recurso factible, puesto que mitigaría el impacto ambiental y efecto adverso de su crecimiento inmoderado en cuerpos de agua, al tiempo que puede ser usado en la limpieza de cuerpos acuáticos y podría considerarse en la escala de opciones para originar bioetanol.

Las demás levaduras ambientales podrían constituir una forma rentable de producir etanol a partir del hidrolizado. Plantas de crecimiento rápido son fuentes potenciales para producir un grado utilizable de etanol para la producción de energía y la frecuencia de cosecha de los productos acuáticos tiende a ser en el orden de días, mientras que la frecuencia de árboles y cultivos que podrían ser utilizados en esta producción están en el orden de meses y años.

Para obtener grandes resultados en este proceso, es indispensable continuar con la ejecución de proyectos investigativos dirigidos al uso de cepas altamente generativas de etanol, como lo es la *Eichhornia crassipes*

Los resultados preliminares sobre la composición de biomasa del Buchón de agua y su reacción ante la biotransformación a etanol evidencian que es apto de ser utilizado con este objetivo y que el tratamiento de hidrólisis ácida y alcalina es capaz de liberar azúcares que son consumidos por la *Cándida Utilis*.

## BIBLIOGRAFIA

- Antioquia, U. d. (2018). Colombia una potencia en energías alternativas. *Centro Virtual de Noticias*.
- Biocombustibles. (2007). *Biocombustibles Biodiesel-Biotenol*. Bogotá D.C: I Seminario-Taller.
- Briceño, C. O. (2004). Etanol como Combustible para Vehículos. *CENICAÑA*.
- Chacón, A. (2004). *Perspectivas actuales de la proteína unicelular (SCP) en la agricultura y la industria*. Agron. Mesoamericana.
- ChemicalSafetyFacts.org. (04 de 01 de 2008). *ChemicalSafetyFacts.org*. Obtenido de <https://www.chemicalsafetyfacts.org/>
- Choi, M. H. (2003). *Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage*. Biomass and Bioenergy.
- Covarrubias, M. (s.f.). *Acervos Digitales Universidad de las Américas Puebla*. Obtenido de [http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lbi/martinez\\_r\\_l/capitulo2.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lbi/martinez_r_l/capitulo2.pdf)
- Cuchimaque, Y. A. (2018). *Diseño y optimización de un sistema piloto de fermentación en batch para la producción de bioteno*. Bogotá.
- Enriquez. (2004). Etanol: Análisis de Estudio de Cadena Etanol. *Cadena Agroindustrial*.
- Fajardo C., E., & Sarmiento F., S. (2008). *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. Facultad de ciencias Básicas. Microbiología Industrial.
- Ferrer, J. R., Davalillo, Y., Chandler, C., & Páez, G. (2004). *Producción de proteína microbiana a partir de desechos de procesamiento de la caña de azúcar (bagacillo)*. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal.
- García, G. M., & Gómez, R. L. (2004). *Single cell protein: yeasts and bacteria*. Encyclopedia of Food Microbiology.
- Garzon, S., & hernandez, C. (2009). *ESTUDIO COMPARATIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL ENTRE Saccharomyces cerevisiae silvestre, Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 Y Candida utilis ATCC 9950*. Pereira: UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA FACULTAD DE TECNOLOGÍAS ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA QUÍMICA INDUSTRIAL.
- Gualtieri, M., Villalta, C., Díaz, L., Medina, G., & Lapena, E. (2007). *Producción de biomasa de Saccharomyces cerevisiae y Candida utilis usando residuos de pulpa de Coffea arabica*. Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel.
- Jose, M. G. (2004). El precio de la melaza continua creciendo. *Nota tecnica Sucromiles SA*.
- Lehninger, A. (1997). Las bases moleculares de la estructura y función celular. En A. L. LEHNINGER, *BIOQUÍMICA: LAS BASES MOLECULARES DE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN CELULAR (2ªED.)* (págs. 409-437). Omega.
- Levtona, F. (2006). Energías "Alternativas. *Revista Ciencia y Tecnología*.
- Madigan T., M., Martinko M., J., & Parker, J. (2003). *Brock Biología de los microorganismos*. Pearson Prentice Hall.
- Meade P., G. (1986). *Manual del Azúcar de Caña*. Barcelona: Montaner y Simón S.A.

- Mora L., R. F., & Bravo R., C. I. (2014). *OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR A PARTIR DE LACTOSUERO*. Ibarra: UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE.
- Parajó, J. C., Santos, V., Domínguez, H., & Vázquez, M. (2000). *Protein concentrates from yeast cultured in wood hydrolysates*. Food Chemistry.
- Pedraza, R. (2000). *Bagazo rico en proteína (Bagarip). Alimento animal obtenido por fermentación en estado sólido*. Revista Producción Animal.
- Prescott Cate, S., & Cecil Gordon, D. (1992). *Microbiología Industrial*. Aguilar Madrid.
- Rios del Risco, C., Fajardo, M., & Pérez M., J. C. (2005). *Evaluación de una cepa de levadura para fermentar diferentes concentraciones de miel Apis mellifera*. Estacion Experimental apicola Cuba.
- Salomon, R. (01 de 01 de 2000-2007). *Red Solar*. Obtenido de Cuba Solar:  
<http://www.cubasolar.cu>
- Tomass, M. (2004). *Tolerancia de las Levaduras de etanol*. Universidad de la republica Uruguay, Facultada de Quimica.
- Universidad Iberoamericana, C. d. (03 de 06 de 2013). *Hablemos Claro*. Obtenido de <http://hablemosclaro.org/ingrepedia/etanol-alcohol/>
- Vazquez, H., & Dacosta, O. (2007). *Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas*.